

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C08B 37/04, A61L 31/00 A23L 1/0532, A61L 15/00 A61K 6/10, 9/48, 47/36 A61K 49/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/16111 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. August 1993 (19.08.93)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE93/00136		(74) Anwalt: PÖHNER, Wilfried; Kaiserstraße 27, Postfach 63 23, D-8700 Würzburg 1 (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 12. Februar 1993 (12.02.93)		
(30) Prioritätsdaten: P 42 04 012.4 12. Februar 1992 (12.02.92) DE		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(71)(72) Anmelder und Erfinder: ZIMMERMANN, Ulrich [DE/DE]; Pfarrer-Fröhlich-Str. 17, D-8702 Waldbrunn (DE).		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : FEDERLIN, Konrad [DE/DE]; Ehrsamer Weg 21b, D-6300 Gießen (DE). ZE-KORN, Tobias [DE/DE]; Liebigstraße 57, D-6300 Gießen (DE). KLÖCK, Gerd [DE/DE]; Sudetenstraße 9a, D-8702 Zell am Main (DE).		

(54) Title: MITOGEN-FREE SUBSTANCE, ITS PREPARATION AND ITS USE**(54) Bezeichnung:** MITOGENFREIE SUBSTANZ, DEREN HERSTELLUNG SOWIE VERWENDUNG**(57) Abstract**

Proposed is a mitogen-free substance comprising cross-linked copolymers including 10 to 90 mole % of guluronic acid, the balance being made up of mannuronic acid. The substance has a molecular weight of from 10,000 to 500,000 Daltons. Also proposed are methods for preparing such substances and their use.

(57) Zusammenfassung

Vorgeschlagen wird eine mitogenfreie Substanz, die Mischpolymere von 10 bis 90 Molprozent Guluronsäure und aus jeweils auf 100 % ergänzend Mannuronsäure aufweist, die ein Molekulargewicht von 10 000 bis 500 000 Dalton besitzen. Des Weiteren werden Verfahren zu deren Herstellung sowie Verwendung vorgeschlagen.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NZ	Neuseeland
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	PL	Polen
BJ	Benin	IE	Irland	PT	Portugal
BR	Brasilien	IT	Italien	RO	Rumänien
CA	Kanada	JP	Japan	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SD	Sudan
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KZ	Kasachstan	SK	Slowakischen Republik
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	SU	Soviet Union
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TD	Tschad
CZ	Tschechischen Republik	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Deutschland	MG	Madagaskar	UA	Ukraine
DK	Dänemark	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
ES	Spanien	MN	Mongolei	VN	Vietnam
FI	Finnland				

-1-

Mitogenfreie Substanz, deren Herstellung

sowie Verwendung

5

Die Erfindung betrifft eine mitogenfreie Substanz
unter Verwendung von Guluron-Säure oder Mannuron-
Säure, deren Herstellung sowie Verwendung.

Gemäß üblicher Terminologie definiert der Begriff
mitogen jene Substanzen, die Zellen zu Teilungen
anregen, die andernfalls, d.h. ohne Einwirkung die-
ser Substanz, nicht zu einer Teilung geführt wür-
den. Die hierdurch im Organismus ausgelösten Reak-
tionen sind von der Norm abweichend und können sich
als allergische, immunologische und pyrogene (Ent-
zündungs-) Reaktionen äußern. Keiner näheren Er-
läuterungen bedarf, daß die Schaffung und Herstel-
lung mitogenfreier Substanzen für den Kontakt mit
lebenden Organismen in Biologie und Medizin von
allergrößtem Interesse sind.

Auf dem Gebiet der Implantatchirurgie ist der Ein-
satz mitogenfreier Substanzen von allergrößter Be-
deutung, um die andernfalls induzierten und zur
Abstoßung des Implantats führenden immunologischen
Reaktionen zu unterdrücken. Bei zahlreichen Erkran-
kungen werden lebende Zellen in den Organismus ein-
gebracht, die einerseits durch Nährstoffe versorgt
werden und andererseits entsprechend dem jeweiligen
Bedarf Zellsekrete, Hormone oder dgl. produzieren
und abgeben, um eine Unterproduktion oder den völ-

ERSATZBLATT

- 2 -

ligen Ausfall der körpereigenen Zellen zu kompen-
sieren. Eine der bekanntesten Erkrankungen dieser
Art ist die Diabetes, bei der zwar die Fehlmenge
des benötigten Insulins im zeitlichen Abstand durch
5 wohldosierte äußere Zufuhr ausgeglichen werden
kann, bei der jedoch festzustellen ist, daß eine
exakte Dosierung über den Tagesverlauf im Sinne ei-
nes Regelsystemes nie realisierbar ist, so daß
Schwankungen und Abweichungen vom Idealwert unver-
meidbar sind. Dieser Nachteil läßt sich durch Im-
10 plantieren lebender Zellen in den Organismus besei-
tigen, wobei jedoch zur Unterdrückung immunologi-
scher Reaktionen die Zellen in Kapseln unterzubrin-
gen sind, die ihrerseits folgenden Anforderungen
15 genügen müssen: Zum einen muß eine ungehinderte
Diffusion durch die Wandungen im Sinne einer Zufuhr
von Nährstoffen und andererseits die Abgabe der
Zellsekrete, Hormone und dgl. nach außen gewährlei-
stet sein. Weiter muß sichergestellt sein, daß das
20 Implantat keine Immunreaktionen hervorruft, d.h.
mitogenfrei ist, was sich u.a. anderenfalls dadurch
äußern würde, daß sich die Kapsel oberflächlich
nach einer gewissen Dauer mit fibrotischem Bewuchs
25 zusetzen und die unabdingbare Zirkulation und Aus-
tausch von Nährstoffen und Zellsekreten unterbinden
würde.

Ziel vorliegender Erfindung ist zunächst die Schaf-
30 fung einer mitogenfreien Substanz, die auch nach
längerem Kontakt mit dem lebenden Organismus keine
allergischen, immunologischen und pyrogenen Reak-
tionen zeigt sowie deren Herstellung und Verwen-

- 3 -

dung.

5 Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch Mischpolymere, die aus 10 bis 90 Molprozent Guluronsäure und aus jeweils auf 100 % ergänzend Mannuronsäure bestehen sowie ein Molekulargewicht der Mischpolymere von 10 000 bis 500 000 Dalton.

10 Die mitogenfreie Substanz weist als unter Umständen einzige Komponente ein Mischpolymer aus Guluronsäure und Mannuronsäure, wobei die molare Zusammensetzung der Guluronsäure 10 bis 90 Prozent und der Rest Mannuronsäure beträgt. Eine Aussage über die Größe des sich durch Polymerisation ausbildenden Mischpolymers ist aufgrund des vorgegebenen Molverhältnisses beider Säuren noch nicht festgelegt. Es können demnach auch Mischpolymere mit niedrigem Molekulargewicht beschrieben werden, die die gestellten Anforderungen nicht erfüllen. Zusätzliche Voraussetzung ist deshalb, daß das Mischpolymer ein Molekulargewicht von 10 000 bis 500 000 Dalton besitzt. Diese Molekulargewichte lassen sich relativ einfach durch Verwendung von Membranen und Filter mit geeigneter Durchlässigkeit und Porenradius durch Dialyse gewinnen.

15

20

25

Der Nachweis der Mitogenfreiheit geschieht in der Weise, daß die mit Calcium polymerisierte Substanz auf das Induzieren in vitro von meßbarer Proliferation von Milz-Lymphozyten überprüft wird. Zu diesem Zwecke werden Milzzellen aus Mäusen des Inzuchstamms Balb-c gewonnen. Die Zellen wurden bei einer Zellzahl von $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ in Wachstumsmedium RPMI

30

- 4 -

- 1640 Medium, 10% fötales Kälberserum (Boehringer, Mannheim, Deutschland), 2 mM L-Glutamin, 2 mM Na-triumpyruvat, nichtessentieller Aminosäure (1x, Boehringer, Mannheim, Deutschland), 50 µM 2-Mercaptoethanol, 100 units ml⁻¹ Penicillin und 100 µg ml⁻¹ Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) in Gegenwart von 100 µg ml⁻¹ der mitogenen Substanz bei 37° Celsius kultiviert. Die Lymphozyten zeigten weder einen signifikanten Einbau von ¹⁴C- oder ³H-Thymidin in säurefällbare zelluläre Substanzen (nach 3 Tagen gemessen) noch ein mikroskopisch feststellbares Wachstum (mikroskopische Zellzahlbestimmung nach 5 bis 9 Kulturtagen).
- 15 Im Rahmen der Erfindung steht grundsätzlich frei, ob neben dem vorgenannten Mischpolymer zusätzliche, im Hinblick auf den Mitogenitätstest ebenfalls unbedenkliche Komponenten beigemischt sind.
- 20 Aus der Mitogenfreiheit der Substanz folgt nicht zwingend die Biokompatibilität in vivo. Vielmehr hängt letztere Eigenschaft von weiteren Faktoren, u.a. der Oberflächenbeschaffenheit des Implantats sowie dem Implantationsort ab. Dennoch ist von Vorteil die sich als biokompatibel erweisenden Verbindungen auszuwählen. Die Biokompatibilität wird anhand von Tierversuchen an Mäusen und Ratten im Hinblick auf das Auslösen von Fremdkörperreaktionen untersucht. In konkreter Durchführung werden hierzu Kapseln aus mit Barium oder Kalzium polymerisierten Substanzen hergestellt und intraperitoneal in diesen Tieren implantiert. Es trat weder ein fibroti-
- 5
- 10
- 25

- 5 -

scher Bewuchs noch eine Fremdkörperreaktion im umgebenden Gewebe auf. Im konkreten Fall wurde eine zweiprozentige Lösung der Substanz in 0,9 % NaCl mit 20 mM BaCl₂ polymerisiert, wodurch sich Gelkugeln von 0,5-1 mm Durchmesser bildeten. Diese wurden mit 0,9 % NaCl gewaschen, zwei Tage lang in RPMI 1640 Medium inkubiert und dann in das Peritoneum von Mäusen und Ratten implantiert. Nach drei Wochen wurden die Kapseln durch Ausspülen des Peritoneums zurückgewonnen und histologisch analysiert.

Eine weitere zusätzliche Charakterisierung der mitogenfreien Substanz macht sich die elektrophoretische Beweglichkeit zunutze und ist wie folgt:
Die Substanz besteht aus einer als Mischpolymer ausgebildeten Komponenten, die aus 10 bis 90 Molprozenten Guluronsäure und komplementär, d.h. 90 bis 10 % Mannuronsäure, aufgebaut ist. Die aufgrund dieser chemischen Zusammensetzung definierten und möglichen Mischpolymere können im Hinblick auf die Molekülgröße und der jeweiligen molekularen Konfiguration sehr unterschiedlich sein. Um hieraus die mitogenfreie Substanz zu gewinnen, werden die unterschiedlichen Mischpolymere einer trägerfreien Elektrophorese unterzogen, wobei die hier interessierenden Fraktionen einer Beweglichkeit zwischen $3-5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{v}^{-1} \emptyset \text{ s}^{-1}$ aufweisen.
Spezielle Versuche in diesem Zusammenhang wurden bei einer Trennkammerdimension von 30 · 130 · 0,3 mm, einer Kammerpuffertemperatur von 22° C, einer Kammerpufferzusammensetzung von 15 mM Triethanolamin, 7,1 mM Kaliumazetat, 216 mM Glycin (pH 7,2), 11 mM Glukose, 0,2 mM Ethylendiaminetetraacetat,

- 6 -

100 Einheiten ml^{-1} Penicillin, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Streptomycin, Leitfähigkeit $1,9 \text{ mS cm}^{-1}$. Der Puffer wurde mit einer Geschwindigkeit von $2,5 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$ durch die Kammer gepumpt. Die Pumpe wurde mit einer Rate von $350 \mu\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$ injiziert. Die Feldstärke betrug $100 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ (die Stromstärke 65 mA).
5 Als zusätzliche Bedingung muß die Substanz ein Molekulargewicht zwischen 10 000 und 500 000 Dalton aufweisen. Im Wege der Diffusion durch eine Membran lassen sich eine Separation der Mischpolymere dieses Molekulargewichtes erreichen.
10

Die Bedeutung der erfinderischen Leistung der hier vorgeschlagenen Substanz läßt sich daraus erkennen, daß die Fachwelt unter Hinweis auf konkrete Erfahrungen und Versuche der Auffassung ist, daß Manuronsäure und manuronsäurehaltige Mischpolymere als Substanz selbst mitogen wäre (Fundstelle Journal of Immunotherapy 10, Seite 286-291, 1991 Raven Press, New York; Transplantation Proceedings Vol. 23, No. 1 (February) 1991, Seite 758-759). Das Verdienst vorliegender Erfindung ist die Erkenntnis der Unrichtigkeit dieser Behauptung. Hinzu kommt weiter, daß Alginate grundsätzlich mitogene Reaktionen zeigen, die jedoch - hierin liegt eine weitere entscheidende Erkenntnis - durch die aufgrund der Herleitung und Extraktion aus Naturprodukten nicht auszuschließenden Verunreinigung durch Umwelteinflüsse zurückzuführen sind.
15
20
25

30

Bei entsprechenden Herstellungsverfahren lassen

- 7 -

sich ausgehend Rohalginaten Substanzen herleiten, die sich durch mitogenfreie Eigenschaften auszeichnen.

- 5 Im folgenden werden zwei Verfahren zur Herstellung der vorerwähnten mitogenfreien Substanzen angegeben. Im ersten finden Verfahren derträgerfreien Elektrophorese Anwendung und im zweiten erfolgt eine Gewinnung durch chemische Reaktion. Beiden
- 10 Verfahren gemeinsam ist das Ausgangsmaterial Alginat, was durch Extraktion aus Pflanzen, Algen, Bakterien und dgl. gewonnen wird und käuflich erwerbar ist.
- 15 Eine bis zu 10%-ige Alginatlösung wird in einen Elektrophoresepuffer mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $2 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ eingegeben. Es erfolgt eine Trennung in einzelne Fraktionen unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit, die getrennt aufgefangen werden. Es interessiert hier eine elektrophoretische Beweglichkeit von $3-5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{v}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Anschließend erfolgt in einer zusätzlichen Dialyse gegen Wasser eine Separation nach der Diffusionsfähigkeit, die sich durch das Molekulargewicht unterscheidet. Zur Erhaltung einer mitogenfreien Substanz werden Molekulargewichte von 10 000 bis 500 000 Dalton aus dem gesamten Mischpolymer gewonnen.
- 20 25
- 30 Das nunmehr im folgenden beschriebene Herstellungsverfahren auf chemischer Basis ist dadurch charakterisiert, daß das durch Extraktion aus Pflanzen, Algen, Bakterien oder dgl. gewonnene Alginat zu-

- 8 -

nächst zu einem unlöslichen Komplex vernetzt, der eine Reinigung und Extraktion sowie eine anschließende Rückgewinnung zuläßt. Bei diesem Verfahren werden die Alginat durch Zugabe von Ba^{++} -Ionen oder vergleichbaren multivalenten Kationen (Blei Pb, Kupfer Cu), die eine vergleichbare oder höhere Affinität zum Alginat haben als Barium, ausgefällt. Anschließend erfolgt eine Extraktion durch Säure, wie beispielsweise Essigsäure über mehrere Stunden bei erhöhter Temperatur. Nach einem Waschen folgen weitere Extraktionen mit Komplexbildnern, wie z.B. Zitronensäure im alkalischen Bereich. Nach Waschen im destillierten Wasser werden die Gelkugeln mehrere Stunden mit Alkohol, z.B. Äthanol, gerührt. Das Freisetzen der nunmehr gereinigten, jedoch nach wie vor vernetzten Alginat erfolgt durch Beigabe von EDTA (Ethylendiamin-Tetraessigsäure) im stark alkalischen Bereich. Hierbei lösen sich die Gelkugeln auf. Das Resultat ist eine aus Rohalginat gewonnene mitogenfreie Substanz.

Im folgenden wird ein auf chemischer Basis durchgeführter Herstellungsvorgang in allen Einzelheiten beschrieben:

Eine 2 bis 4%-ige Lösung von Rohalginat wird über ein Membranfilter von 0,22 μm Porenweite filtriert und dann unter Rühren in das 5-fache Volumen einer 50 mM-Bariumchloridlösung eingetropft, wodurch Gelkugeln von ca. 1-5 mm Durchmesser entstehen. Nach 10 bis 20 Minuten erfolgt ein Waschen der Gelkugeln in destilliertem Wasser und anschließend zweimal für 3-4 Stunden in je 1 Liter 1M Essig-

- 9 -

- säure/10 mM BaCl₂ bei 60-80°C gerührt. Anschließend werden die Gelkugeln auf einem Sieb mit destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht in zweimal 1 Liter 500 mM Zitronensäure (pH-Wert 8,0 mit KOH) gerührt, wobei nach 4 Stunden ein Mediumwechsel erfolgt. Nach nochmaligem Waschen der Gelkugeln im destillierten Wasser und für 2 - 3 Stunden in 500 ml 80 % Ethanol werden sie anschließend für je 1 Stunde in 1 bis 2 Stunden in destilliertem Wasser gerührt.
- Die Gelkugeln werden über ein Sieb dekantiert und in 200 ml einer 250 mM EDTA-Lösung (pH 10,0 mit KOH) suspendiert. Nach Rühren über Nacht haben sich die Kugeln aufgelöst. Die Lösung wird dreimal für mindestens 4 Stunden gegen 2-3 Liter destilliertem Wasser (pH 8,5 mit KOH) dialysiert und dann gefriergetrocknet.
- Ohne Einschränkung der Allgemeinheit werden im folgenden einige Anwendungen der erfindungsgemäß angegebenen mitogenfreien Substanzen aufgezeigt. Sie haben gemeinsam, daß sie vom tierischen oder vom menschlichen Körper problemlos aufgenommen und auch bei langzeitlicher Anwendung die Auslösung mitogener Reaktionen mit Sicherheit ausschließen.
- Als erstes ist das Gebiet der Transplantationschirurgie zu erwähnen, bei welchem mitogenfreie Substanzen dazu eingesetzt werden können, lebende Zellen nach Art einer Kapsel einzuschließen und ohne die Auslösung immunologischer Reaktionen im Körper

- 10 -

des Menschen implantieren zu können. Als besonders bedeutungsvolles Beispiel wird die Einbringung von insulinerzeugenden Zellen (Inseln) in die aus mitogenfreien Substanzen bestehende Kapsel angegeben,
5 die ausweislich von Tierversuchen auch nach langer Implantation nicht zu fibrotischem Bewuchs neigen. Gleichzeitig erlaubt die Kapsel das Eindringen der für die Aufrechterhaltung des Zellwachstums erforderlichen Nährstoffe und andererseits die Abgabe der hierbei erzeugten Hormone - im Falle der Diabetes handelt es sich um das Insulin - nach außen zu ermöglichen. Man macht sich die Durchlässigkeit für Glucose, Sauerstoff, Peptid-Hormone, zu denen das
10 Insulin zu rechnen ist, zunutze, bei gleichzeitiger Undurchlässigkeit für größere Moleküle, z.B. der Antikörper. Das Anbringen lebender Zellen (Langerhaussche Inseln) erlauben eine ideale Anpassung im Sinne eines Regelprozesses an den augenblicklichen
15 Hormonbedarf.
20 Weiterhin eignet sich die Verwendung mitogenfreier Substanzen in besonderer Weise zur Beigabe zu Nahrungsmitteln, wo sie bekanntlich die Gelierung und Stabilisierung unterstützen. Statistische Untersuchungen lassen Zusammenhänge zwischen der Verwendung der (bisherigen) Alginate mit der Häufigkeit
25 der Entstehung von Krebs des Magen/Darmtraktes vermuten. Diese momentan eingesetzten Alginate sind mit Verunreinigungen versehen und deshalb, wie die Erfahrung erkannt hat, mitogen. Der Ersatz durch mitogenfreie Alginate hätte erhebliche gesundheitliche Vorzüge.
30

- 11 -

5

10

Schließlich lassen sich mitogenfreie Substanzen als Wundverschlüsse bei Verletzungen, als auch innerlich bei Geschwüren, insbesondere Magengeschwüren, einsetzen. Sie können als zahnärztliche Abdruckmassen gefahrlos Verwendung finden und schließlich in der Galenik als Kapseln oder Kugeln, die als Trägersubstanz für Medikamente dienen und die sich im Magen oder Darm unter Freisetzung des eingeschlossenen Medikamentes auflösen. Gleichermaßen kann es als Trägersubstanz für Kontrastmittel dienen, in dem z.B. Luft in Bläschenform aufgenommen und eingeschlossen wird, das der Kontrastierung bei Ultraschallaufnahmen dient.

- 12 -

P A T E N T A N S P R Ü C H E

5

1. Mitogenfreie Substanz unter Verwendung von Gulu-
ron-Säure oder Mannuron-Säure, **gekennzeichnet durch**
Mischpolymere, die aus 10 bis 90 Molprozent Gulu-
ronsäure und aus jeweils auf 100 % ergänzend Man-
nuronsäure bestehen sowie ein Molekulargewicht der
Mischpolymere von 10 000 bis 500 000 Dalton aufwei-
sen.

- 15 2. Substanz nach Anspruch 1, **gekennzeichnet durch**
Biokompatibilität.

- 20 3. Mitogenfreie Substanz nach Anspruch 1 **gekenn-**
zeichnet durch eine elektrophoretische Beweglich-
keit der Mischpolymere von $3-5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{v}^{-1} \cdot$
 s^{-1} .

- 25 4. Verfahren zur Herstellung der mitogenfreien Sub-
stanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch ge-**
kennzeichnet, daß eine bis zu 10%-ige Alginatlösung
durch trägerfreie Elektrophorese in unterschiedli-
che Fraktionen separiert wird und anschließend die
Fraktion mit einer elektrophoretischen Beweglich-
keit von $3-5 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{v}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ eine Dialyse
zur Separierung der Moleküle mit einem Gewicht von
10 000 bis 500 000 Dalton erfolgt.

- 13 -

- 5 5. Verfahren zur Herstellung einer mitogenfreien Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Alginatlösung durch die Zugabe von Barium oder multivalenten Kationen (z.B. Blei Pb, Kupfer Cu), die eine vergleichbare oder höhere Affinität zum Alginat als Barium haben, zu einem unlöslichen Komplex ausgefällt werden, dann
10 eine Extraktion durch Säure, z.B. Essigsäure, über mehrere Stunden bei hoher Temperatur erfolgt, anschließend nach einer Waschung eine weitere Extraktion mit Komplexbildner, z.B. Zitronensäure, im alkalischen Bereich über mehrere Stunden vorgenommen wird, nach einem weiteren Waschen mit destillierten Wasser eine Behandlung über mehrere Stunden mit Alkohol, z.B. Ethanol, und schließlich ein Freisetzen der Alginate durch Zugabe von EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) im stark-alkalischen Bereich erfolgt.
- 15 20
25 6. Mitogenfreie Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie als Implantat, vorzugsweise als im Innern mit lebenden Zellen bestückte Kapseln, in der Transplantationschirurgie verwendet werden.
- 30 7. Mitogenfreie Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **gekennzeichnet** als Stabilisierungs- und Glierzusatz für Nahrungsmitteln.

- 14 -

5

8. Mitogenfreie Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 3, gekennzeichnet als innerlich und/oder äußerlich angewandtes Wundverschlußmaterial und/oder zahnärztliche Abdruckmasse und/oder für als Träger-
substanz für Medikamente oder Kontrastmittel die-
nende Kapseln und Kugeln.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 93/00136

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5 C08B37/04; A61L31/00; A23L1/0532; A61L15/00; A61K6/10; A61K9/48;
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC A61K47/36; A61K49/00

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5 C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	ELECTROPHORESIS Vol. 13, NO. 5, 1992, WEINHEIM, DE pages 269 - 274 U. ZIMMERMANN ET AL. 'Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis' see the whole document ---	1-4, 6
A	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY Vol. 89, 1974, IT pages 99-102 C. BUCKE 'Polyacrylamide gel electrophoresis of alginic acid' see abstract see page 102, line 7 - line 12 ---	1
A	DATABASE WPIL Section Ch, Week 8644, Derwent Publications Ltd., London, GB; -/-	1, 6-8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 May 1993 (19.05.93)

Date of mailing of the international search report

3 June 1993 (03.06.93)

Name and mailing address of the ISA:

European Patent Office
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

-2-

International application No.

PCT/DE 93/00136

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>Class D, AN 86-290660 & SU, A, 1219041 (MOSC NATION ECONOMY) 23 March 1986 see abstract</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

PCT/DE 93/00136

Internationales Aktenzeichen

I. KLASSEKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationsymbolen sind alle anzugeben) ⁶			
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC			
Int.K1. 5 C08B37/04; A61K6/10;	A61L31/00; A61K9/48;	A23L1/0532; A61K47/36;	A61L15/00 A61K49/00
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE			
Recherchierte Mindestprüfstoff ⁷			
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole		
Int.K1. 5	C08B		
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸			
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹			
Art. ¹⁰	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³	
P, X	ELECTROPHORESIS Bd. 13, Nr. 5, 1992, WEINHEIM, DE Seiten 269 - 274 U. ZIMMERMANN ET AL. 'Production of mitogen-contamination free alginates with variable ratios of mannuronic acid to guluronic acid by free flow electrophoresis' siehe das ganze Dokument ---	1-4, 6	
A	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY Bd. 89, 1974, IT Seiten 99 - 102 C. BUCKE 'Polyacrylamide gel electrophoresis of alginic acid' siehe Zusammenfassung siehe Seite 102, Zeile 7 - Zeile 12 ---	1	
		-/-	
<p>⁶ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰ :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>⁷ "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfahrung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfahrung kann nicht als neu oder auf erfunderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfahrung kann nicht als auf erfunderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>			
IV. BESCHEINIGUNG			
2	Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 19. MAI 1993	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts - 3. 06. 93	
Internationale Recherchenbehörde EUROPAISCHES PATENTAMT		Unterschrift des bevolmächtigten Bediensteten MAZET J.-F.	

III. EINSCHLAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE WPIL Section Ch, Week 8644, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class D, AN 86-290660 & SU,A,1 219 041 (MOSC NATION ECONOMY) 23. März 1986 siehe Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	1,6-8